

ORIGINAL ARTICLE

Optimisation de l'Extraction de la Dextrinase Limite de la Variété de Sorgho Camerounais *Safrari*

Annick Chancelle Nguemogne^a / Steve Carly Zangué Desobgo^{b*} / Emmanuel Jong Nso^a /

Authors' Affiliation

^aUniversité de Ngaoundéré, Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI), Département Génie des Procédés et Ingénierie, Laboratoire Génie et Technologie Alimentaire (LAGETA), BP 455 ENSAI Ngaoundéré, Cameroun

^bUniversité de Ngaoundéré, Institut Universitaire de Technologie (IUT), Département Génie Alimentaire et Contrôle Qualité, Laboratoire de Bioprocédés (LBP), BP 455 IUT Ngaoundéré, Cameroun

Corresponding author

Steve Carly Zangué Desobgo

^bUniversité de Ngaoundéré, Institut Universitaire de Technologie (IUT), Département Génie Alimentaire et Contrôle Qualité, Laboratoire de Bioprocédés (LBP), BP 455 IUT Ngaoundéré, Cameroun

Email:

desobgo.zangue@gmail.com

Funding source

None.

Résumé

La méthodologie des surfaces de réponses, utilisant un plan de Doehlert à 4 facteurs, a été utilisée pour optimiser l'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*. Les facteurs étudiés ont été la température, le pH, le ratio masse de malt/volume de tampon (m/v) et le temps. Le modèle généré reliant l'activité enzymatique de la dextrinase limite aux précédents facteurs a été validé. L'analyse de variance a montré que trois effets simples (température, ratio et temps), une interaction (pH/temps d'extraction) et tous les effets quadratiques influencent significativement ($P < 0,05$) l'activité enzymatique de la dextrinase limite pendant l'extraction. Tous les effets significatifs à l'exception de l'interaction pH/temps ont contribué à baisser l'activité enzymatique de la dextrinase limite. Les valeurs trouvées pour une extraction optimale sont 23 °C, 10 h, 5,0 et 5/32 respectivement pour la température, le temps, le pH et le ratio masse de malt/volume de tampon. L'expérimentation de cette condition a conduit à une activité enzymatique optimale en dextrinase limite de 140 mU/mL.

Application pratique

La dextrinase limite obtenue à partir de la variété de sorgho camerounais *Safrari*, peut être utilisée pour réduire la turbidité des moûts et principalement, lors du brassage avec les céréales qui conduisent à des bières opaques. Ceci est assez important car aucune des enzymes utilisées par les usines brassicoles au Cameroun sont d'origine locale.

Mots clés : *Safrari*, Extraction, Optimisation, Dextrinase limite, Activité enzymatique.

Abstract

The response surface methodology, using a 4-factor Doehlert design, was used to optimize the extraction of limit dextrinase from *Safrari* sorghum malt. The factors studied were temperature, pH, mass ratio of malt / volume of buffer (m / v) and time. The generated model linking dextrinase limit activity to the previous factors has been validated. The analysis of variance showed that three simple effects (temperature, ratio and time), an interaction (pH / extraction time) and all the quadratic effects significantly influence ($P < 0.05$) the activity of limit dextrinase during extraction. All of the significant effects except the pH / time interaction contributed to lower activity of limit dextrinase. The values found for optimal extraction are 23 °C, 10 h, 5.0 and 5/32 respectively for temperature, time, pH and the ratio mass of malt / volume of buffer. The experimentation with this condition led to an optimal enzymatic activity in limit dextrinase of 140 mU/mL.

Practical Application

Limit dextrinase obtained from the Cameroonian sorghum variety *Safrari* can be used to reduce the turbidity of worts especially when brewed with cereals which lead to opaque beers. This is quite important because none of the enzymes used by brewing factories in Cameroon are from local origin.

Keywords: *Safrari*; Extraction, Optimization, Limit dextrinase, Enzyme activity

1. Introduction

L'extraction enzymatique à partir de sources végétales a pour but soit de déterminer l'activité enzymatique dans un extrait brut, soit de purifier des quantités relativement grandes d'enzymes (Piggott, 2002). Ce potentiel est exploitable par optimisation d'une part des conditions de synthèse de celles-ci, et d'autre part des conditions d'extraction. L'extraction de la dextrinase limite à partir des malts de céréales a fait l'objet de plusieurs travaux ayant abouti dans la plupart des cas à sa purification, notamment dans l'orge (Kristensen, Planchot, Abe, & Svensson, 1998; MacGregor, Macri, Schroeder, & Bazin, 1994a; Manners & Yellowlees, 1971), le sorgho (Hardie, Manners, & Yellowlees, 1976), l'avoine (Dunn & Manners, 1975; Yamada, 1981b), le maïs (Beatty *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2009; Wu, Colleoni, Myers, & James, 2002), le riz (Li *et al.*, 2009; Yamasaki, Nakashima, & Konno, 2008) et le blé (Nethrphan, 2002; Repellin, Båga, & Chibbar, 2008). L'approche méthodologique des plans d'expériences s'avère donc inexistante dans les processus d'extraction d'enzymes des céréales. L'optimisation par plans d'expériences a fait ses preuves dans divers secteurs notamment en brasseries (Desobgo, Nso, & Tenin, 2011c, 2011b, 2011a, 2011d; Desobgo, Nso, Tenin, & Kayem, 2010; Evans, Li, & Eglinton, 2010), en malterie (Adefila, Bakare, & Adewale, 2012; Claver, Zhang, Li, Zhou, & Zhu, 2010; Usansa *et al.*, 2011; Zarnkow *et al.*, 2007) et en enzymologie (Anuradha & Valli, 2010; Karmakar & Ray, 2011; Rodríguez-Nogales, Ortega, Perez-Mateos, & Busto, 2007), entre autres. En effet, l'utilisation de la méthodologie de surface de réponses serait plus efficace et satisfaisante que les méthodes classiques d'un facteur à la fois, dans la mesure où plusieurs

variables sont étudiées simultanément avec un nombre minimum d'expériences, permettant de gagner en temps et en coût de procédé (Karmakar & Ray, 2011). Les facteurs majeurs généralement considérés dans les procédés d'extraction enzymatique sont: la température, le pH, la teneur en eau et la force ionique du milieu. Ceux-ci sont choisis de manière à préserver l'activité enzymatique et la stabilité de l'enzyme à extraire (Amersham-Biosciences, 2001; Dennison, 2002). Il s'agira donc dans ce travail, de déterminer les conditions optimales d'extraction de la dextrinase limite de la variété de sorgho *Safrari*.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Il est utilisé ici le malt vert de sorgho *Safrari* germé dans les conditions optimales définies par Nguemogne *et al.* (2018). Cette variété cultivée dans le grand Nord du Cameroun a été obtenue auprès de l'IRAD (Institut de Recherche Agronomique pour le Développement) de Maroua, Cameroun.

2.2. Méthodes

2.2.1. Procédé de maltage

Le maltage a été conduit dans les conditions optimales obtenues par Nguemogne *et al.* (2018). Spécifiquement, des lots de 150 g de grains de sorgho ont été trempés à 25 °C dans 450 mL de solution de NaOH (0,1 %) pendant 24 h avec changement de la solution de trempage après 12 h. Une fois le trempage (à 25 °C) terminé, les grains ont été étalés sur des sacs perforés en plastique, puis recouverts et disposés dans le noir à l'étuve à 25 °C pendant 5 jours pour permettre le processus de la germination. Le malt vert obtenu a été broyé avec ses radicules à l'aide du

broyeur manuel (Victoria, Colombie).

2.2.2. Plan d'expériences pour l'extraction

Un plan d'expérience de Doehlert à quatre facteurs a été utilisé pour effectuer l'extraction. Les facteurs choisis et leur domaine de variation sont regroupés dans le tableau 1. Le choix des facteurs et leurs bornes ont été fait à partir de leur variabilité dans la bibliographie (Heisner & Bamforth, 2008; Kristensen *et al.*, 1998; MacGregor, Macri, Schroeder, & Bazin, 1994b; Nguemogne, Desobgo, & Nso, 2017) et de leur importance dans le procédé d'extraction d'enzymes.

Les opérations de transformation utilisées pour passer des valeurs codées aux valeurs réelles ont été celles de Mathieu & Phan-tan-luu (1997) données par:

$$x_j = \frac{U_j - U_j^0}{\Delta U_j}$$

$$\Delta U_j = \left| \frac{U_j^{\min} - U_j^0}{x_j^{\min}} \right| = \left| \frac{U_j^{\max} - U_j^0}{x_j^{\max}} \right|$$

$$U_j^0 = \frac{U_j^{\max} + U_j^{\min}}{2}$$

Tableau 1: Facteurs d'optimisation de l'extraction et domaines de variation

Facteur	Nom	Abréviation	Unité	Domaine de variation réel	Domaine de variation codé
1	Température	T	°C	[4 – 50]	[-1 ; +1]
2	Potentiel d'hydrogène	pH		[3,5 – 6,5]	[-0,866 ; +0,866]
3	Ratio m/v		g/mL	[1/10 – 1/3]	[-0,816 ; +0,816]
4	Temps d'extraction	t	heures	[1 – 24]	[-0,791 ; +0,791]

Ce plan requiert un nombre d'expériences N:

$$N = k^2 + k + N_0$$

Avec k, le nombre de facteurs et N0 le nombre de répétitions au centre. Ayant quatre facteurs, il a été choisi une matrice de Doehlert à 24 expériences consignées dans le tableau 2.

Ainsi, U_j qui est la variable réelle d'intérêt est :

$$U_j = x_j \times \Delta U_j + U_j^0$$

Avec: x_j = valeur de la variable codée; U_j = valeur de la variable réelle; U_{j0} = valeur de la variable réelle au centre du domaine; U_{jmin} = valeur de la variable réelle à la borne inférieure du domaine; U_{jmax} = valeur de la variable réelle à la borne supérieure du domaine; ΔU_j = pas de variation.

Tableau 2: Matrice d'expériences de Doehlert

N°essai	Matrice d'expériences (valeurs codées)				Matrice d'expériences (valeurs réelles)			
	X1	X2	X3	X4	X1'	X2'	X3'	X4'
1	1	0	0	0	50	5	6,5	12,5
2	-1	0	0	0	4	5	6,5	12,5
3	0,5	0,866	0	0	38,5	6,5	6,5	12,5
4	-0,5	-0,866	0	0	15,5	3,5	6,5	12,5
5	0,5	-0,866	0	0	38,5	3,5	6,5	12,5
6	-0,5	0,866	0	0	15,5	6,5	6,5	12,5
7	0,5	0,289	0,816	0	38,5	5,5	10,0	12,5
8	-0,5	-0,289	-0,816	0	15,5	4,50	3,0	12,5
9	0,5	-0,289	-0,816	0	38,5	4,50	3,0	12,5
10	0	0,577	-0,816	0	27	6,00	3,0	12,5
11	-0,5	0,289	0,816	0	15,5	5,50	10,0	12,5
12	0	-0,577	0,816	0	27	4,00	10,0	12,5
13	0,5	0,289	0,204	0,791	38,5	5,50	7,4	24
14	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	15,5	4,50	5,6	1
15	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	38,5	4,50	5,6	1
16	0	0,577	-0,204	-0,791	27	6,00	5,6	1
17	0	0	0,612	-0,791	27	5	9,1	1
18	-0,5	0,289	0,204	0,791	15,5	5,50	7,4	24
19	0	-0,577	0,204	0,791	27	4,00	7,4	24
20	0	0	-0,612	0,791	27	5	3,9	24
21	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5
22	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5
23	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5
24	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5

Avec X1=X1'= Température ; X2=X2'= pH ; X3=X3'= Ratio m/v ; X4=X4'= Temps

Le plan d'expériences généré a conduit à l'obtention d'un modèle de second degré obtenu grâce au logiciel Statgraphics XV.II. Ce modèle est quadratique:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$$

Où : y = réponse mesurée ; x = facteurs ; β0 = constante ; k = nombre de facteurs ; βj = coefficients des effets linéaires ; βjj = coefficients des effets quadratiques ; βij = coefficients des interactions. Les valeurs moyennes des réponses des essais (en triplicat) ont servi à l'établissement du modèle.

2.2.3. Validation du modèle mathématique

Trois méthodes ont permis la validation du modèle obtenu: La détermination du coefficient de détermination R^2 et du coefficient de détermination ajusté Ra^2 grâce à Statgraphics XV.II; Le calcul de l'analyse absolue de déviation moyenne (AADM), des facteurs polarisé (Bf) et d'exactitude (Afl) grâce à Excel.

Les valeurs acceptables de R^2 , de AADM, de Bf et de Afl signifient que l'équation du modèle décrit le comportement réel du système et qu'elle peut être utilisée pour l'interpolation dans le domaine expérimental.

2.2.4. Procédé d'extraction et test d'activité enzymatique de la dextrinase limite

Ce procédé ainsi que les conditions d'extraction sont résumés à la figure 1. L'activité enzymatique de la dextrinase limite a été déterminée par dosage des sucres réducteurs issus de l'action de la dextrinase limite sur le pullulan, avec la méthode au DNS de Fischer & Stein (1961). Les essais ont été faits en triplicat.

L'activité enzymatique enzymatique ici est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère un μmol de maltose équivalent du pullulan en une minute à 37°C et s'exprime en U/mL.

2.2.5. Effets de l'EDTA, le DTT, le CaCl_2 , le SAB et l'acide ascorbique sur l'extraction et l'activation de la dextrinase limite

Dans ce travail, cinq composés ont été introduits au cours de l'extraction de l'enzyme (figure 2) et, en fonctions des doses recommandées dans la bibliographie. Il s'agit notamment:

-Des antioxydants: le dithiothréitol (DTT) à 1 mM et l'acide ascorbique à 5 mM ;

-Un inhibiteur de métaux: l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 1 mM ;

-Un cofacteur: les ions Ca^{2+} dans le chlorure de calcium (CaCl_2) à 5 mM ;

-Un agent stabilisateur: le sérum albumine bovine (SAB) à 10 mg/mL.

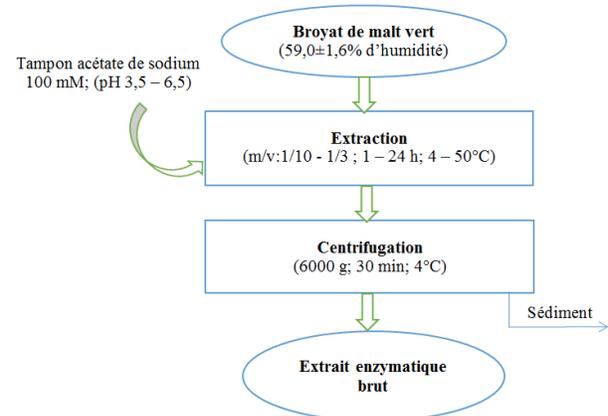


Figure 1: Procédé d'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite

2.2.6. Logiciels

Le logiciel Statgraphics version XV.II (StatPoint, Inc., Virginia 20171, USA), a été utilisé pour la planification expérimentale et les analyses statistiques ; tandis que le logiciel sigmaplot version 12.5 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA 94804-2028, USA) et Excel ont servi aux tracés des courbes.

3. Résultats et Discussion

3.1. Modélisation

Les résultats du tableau 3 ont servi à l'établissement du modèle mathématique (Yact) traduisant l'activité enzymatique de la dextrinase limite en fonction de la température, du pH, du ratio m/v et du temps d'extraction.

Tableau 3: Matrice d’expérimentation pour l’extraction de la dextrinase limite

Expériences	Matrice d’expériences (valeurs codées)				Matrice d’expériences (valeurs réelles)				Réponse (Activité enzymatique en dextrinase limite (mU/mL))
	X1	X2	X3	X4	X1'	X2'	X3'	X4'	
1	1	0	0	0	50	5	6,5	12,5	10,8±0,0
2	-1	0	0	0	4	5	6,5	12,5	94,2±6,0
3	0,5	0,866	0	0	38,5	6,5	6,5	12,5	5,8 ±0,5
4	-0,5	-0,866	0	0	15,5	3,5	6,5	12,5	12,4±0,0
5	0,5	-0,866	0	0	38,5	3,5	6,5	12,5	1,9±0,0
6	-0,5	0,866	0	0	15,5	6,5	6,5	12,5	35,1±0,0
7	0,5	0,289	0,816	0	38,5	5,5	10,0	12,5	1,2±0,0
8	-0,5	-0,289	-0,816	0	15,5	4,50	3,0	12,5	64,1±4,4
9	0,5	-0,289	-0,816	0	38,5	4,50	3,0	12,5	42,8±0,0
10	0	0,577	-0,816	0	27	6,00	3,0	12,5	29,5±1,4
11	-0,5	0,289	0,816	0	15,5	5,50	10,0	12,5	58,7±0,0
12	0	-0,577	0,816	0	27	4,00	10,0	12,5	8,1±0,0
13	0,5	0,289	0,204	0,791	38,5	5,50	7,4	24	22,0±0,0
14	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	15,5	4,50	5,6	1	99,2±14,2
15	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	38,5	4,50	5,6	1	80,3±0,0
16	0	0,577	-0,204	-0,791	27	6,00	5,6	1	13,5±0,0
17	0	0	0,612	-0,791	27	5	9,1	1	74,9±0,0
18	-0,5	0,289	0,204	0,791	15,5	5,50	7,4	24	35,9±0,0
19	0	-0,577	0,204	0,791	27	4,00	7,4	24	0,4±0,0
20	0	0	-0,612	0,791	27	5	3,9	24	56,0±0,0
21	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	127,4±0,0
22	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	134,3±0,0
23	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	143,2±0,0
24	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	134,7±0,0

Le modèle obtenu s’écrit comme suit:

$$Y_{act} = 0,135 - 0,031X_1 - 0,001X_2 - 0,014X_3 - 0,024X_4 - 0,085X_1^2 - 0,011X_1X_2 - 0,020X_1X_3 + 0,012X_1X_4 - 0,133X_2^2 + 0,015X_2X_3 + 0,055X_2X_4 - 0,098X_3^2 - 0,031X_3X_4 - 0,076X_4^2$$

Avec X1 : Température ; X2 : pH ; X3 : Ratio m/v ; X4 : Temps

Ce modèle est polynomial d'ordre 2 avec interactions. Les paramètres de validation du modèle 'Yact' rentrant dans les plages standards (tableau 4), ce modèle est valide (Baş & Boyaci, 2007; Dalgaard & Jørgensen, 1998; Goupy & Creighton, 2006; Joglekar & May, 1987) et reflèterait l'évolution réelle de l'activité enzymatique de la dextrinase limite en fonction des facteurs dans leur plage d'étude. Pour une meilleure évaluation et interprétation de l'influence des facteurs et des interactions entre facteurs sur la réponse, une analyse statistique a été effectuée.

effets quadratiques des quatre facteurs étudiés (temps, température, pH et ratio) et l'interaction pH-temps d'extraction.

L'on peut déduire du tableau 5 que tous les facteurs qui ont une influence significative (à l'exception de l'interaction pH-temps d'extraction) le sont dans le sens négatif (signe des coefficients), ce qui signifie que leur augmentation (effets simples X1, X3, X4) ou leur excès (effets quadratiques X1X1, X2X2, X3X3, X4X4) concoure à inhiber l'extraction et/ou l'activation de la dextrinase limite ; tandis que l'interaction pH-temps d'extraction (X2X4) a l'effet inverse.

Tableau 4: Paramètres de validation du modèle "Y_{act}"

	Abréviation	Valeur obtenue	Plages acceptables
Coefficient de détermination	R ²	96,92%	≥ 92 % (Goupy & Creighton, 2006)
Coefficient de détermination ajusté	R ² a	92,30%	≥80 % (Joglekar & May, 1987)
Analyse Absolue de Déviation Moyenne	AADM	0,04	[0-0,3] (Baş & Boyaci, 2007)
Facteur de Biais	Bf	1,02	[0,75-1,25] (Dalgaard & Jørgensen 1998)
Facteur d'exactitude	Af ₁	1,03	[0,75-1,25] (Dalgaard & Jørgensen 1998)

La table d'ANOVA (tableau 5), renseigne sur les probabilités d'influence des facteurs et de leur interaction au niveau de confiance de 95 %. D'après les valeurs des probabilités de la table d'ANOVA, 08 effets influencent significativement le process au niveau de confiance de 95 % (P < 0,05). Il s'agit de: la température, le ratio et le temps d'extraction, les

3.1.1. Effet de la température d'extraction (X1)

On observe à la figure 2 d'une part, une augmentation non significative d'activité enzymatique de la dextrinase limite avec l'augmentation de la température d'extraction puis d'autre part, une diminution significative (tableau 5) d'activité enzymatique suite à l'augmentation continue de la température. En

effet, on part d'une activité enzymatique de 0,081 U/mL à 4 °C pour atteindre la valeur maximale de 0,137 U/mL à 22,4 °C; suivi d'une diminution d'activité enzymatique jusqu'à 0,019 U/mL à 50 °C.

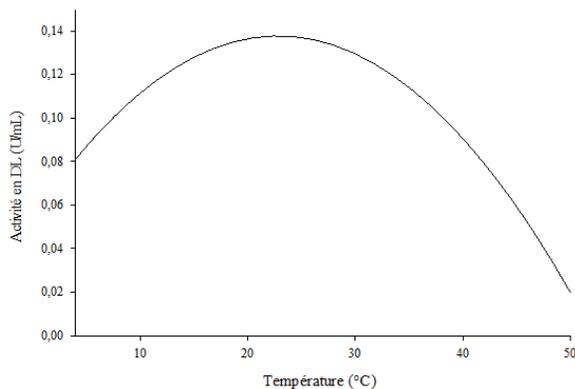


Figure 2: Evolution de l'activité enzymatique de la dextrinase limite en fonction de la température d'extraction (ratio: 1/6, 5; temps: 12, 5 h; pH 5, 0)

L'accroissement d'activité enzymatique avec l'augmentation de la température serait dû à l'augmentation de la quantité de dextrinase limite extraite avec l'élévation de température. En effet, elle accroît l'énergie cinétique des molécules (Hejnaes, Matthiesen, & Skriver, 1998) et par ricochet, la vitesse des échanges entre le solvant (solution tampon) et le soluté (malt). Plus il y a échange, plus la dextrinase limite serait extraite avec pour conséquence directe l'augmentation de sites actifs disponibles pour la fixation du substrat, d'où l'accroissement d'activité enzymatique enzymatique.

Par contre, la chute d'activité enzymatique observée par la suite serait due à la dénaturation progressive de l'enzyme extraite à ces températures. En effet, bien que la vitesse des échanges soit améliorée avec l'accroissement de la température, l'augmentation des vibrations

moléculaires générée conduirait à la rupture des liaisons de faible énergie telles les liaisons ioniques, les liaisons hydrogènes, et même des liaisons covalentes tels les ponts disulfures ; celles-ci rentrant dans la préservation de la structure tertiaire des enzymes (donc de leur activité enzymatique) et même de leur stabilité (Hejnaes *et al.*, 1998; Kotzia *et al.*, 2012). De ce fait, même si l'enzyme est extraite aux fortes températures, elle serait dénaturée et donc non fonctionnelle. Ce résultat est similaire à ceux de plusieurs auteurs qui ont montrés que pendant que la température augmente, la vitesse des réactions enzymatiques croit également, mais en même temps, il y a une inactivation progressive de l'enzyme, qui est de plus en plus prononcée au fur et à mesure que la température augmente (Hejnaes *et al.*, 1998; Rajagopal, Ramakrishnan, & Indhumathi, 2009).

3.1.2. Effet du ratio masse de malt (g)/volume de tampon (mL) (X3)

L'activité enzymatique de la dextrinase limite augmente de façon non significative avec la diminution du ratio jusqu'à un seuil au-delà duquel la diminution continue du ratio entraîne également une diminution cette fois-ci significative (tableau 5) de l'activité enzymatique enzymatique pendant l'extraction (figure 3). En effet, on part d'une activité enzymatique de 0,080 U/mL au ratio 1/3 pour atteindre la valeur maximale de 0,135 U/mL au ratio 1/6 ; suivi d'une diminution d'activité enzymatique jusqu'à 0,058 U/mL au ratio 1/10.

De ce fait, malgré l'importance du rapport solide/liquide dans les procédés d'extraction, des rapports extrêmes sont défavorables pour le cas particulier des extractions enzymatiques. En effet, les ratios élevés limitent la vitesse de transfert de matière (Tucker, 1995).

Tableau 5: Analyse de la variance

Source	Coefficients	Somme des carrés	ddl	Moyenne quadratique	Rapport F	Probabilité
X ₁ :Temp	-0,03	0,00471325	1	0,00471325	26,80	0,0006
X ₂ :pH	-0,001	0,000006331	1	0,000006331	0,04	0,8537
X ₃ :Ratio	-0,014	0,000935196	1	0,000935196	5,32	0,0465
X ₄ :temps	-0,024	0,00294938	1	0,00294938	16,77	0,0027
X ₁ X ₁	-0,085	0,00952569	1	0,00952569	54,17	0,0000
X ₁ X ₂	-0,011	0,0000931129	1	0,0000931129	0,53	0,4853
X ₁ X ₃	-0,020	0,000246747	1	0,000246747	1,40	0,2665
X ₁ X ₄	0,012	0,0000865582	1	0,0000865582	0,49	0,5007
X ₂ X ₂	-0,133	0,0237315	1	0,0237315	134,96	0,0000
X ₂ X ₃	0,015	0,000131867	1	0,000131867	0,75	0,4090
X ₂ X ₄	0,055	0,00167828	1	0,00167828	9,54	0,0129
X ₃ X ₃	-0,098	0,0143274	1	0,0143274	81,48	0,0000
X ₃ X ₄	-0,031	0,000523437	1	0,000523437	2,98	0,1186
X ₄ X ₄	-0,076	0,00970069	1	0,00970069	55,17	0,0000
Erreur totale		0,00158257	9	0,000175841		
Total (corr.)		0,0513865	23			

Par ailleurs, il y a également saturation du milieu en soluté, avec une augmentation de la quantité de matière en suspension, ce qui rend difficile la solubilisation des protéines avec pour conséquence l'agrégation de celles-ci et donc l'absence d'activité enzymatique (GE-Healthcare, 2010; Hejnaes *et al.*, 1998).

De très faibles ratios par contre ont un effet déstabilisateur sur l'enzyme (Tucker, 1995). Par ailleurs, un excès de solvant diminue la concentration enzymatique dans le milieu; et ceci limite à son tour la probabilité de rencontre de l'enzyme avec le substrat (Hejnaes *et al.*, 1998).

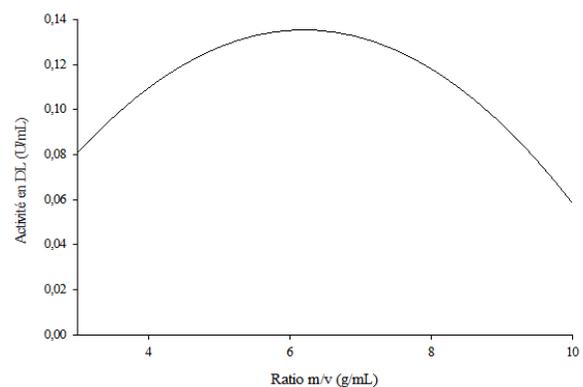


Figure 3: Activité enzymatique de la dextrinase limite en fonction du ratio m/v d'extraction (température: 27 °C; pH 5, 0; temps: 12, 5 h)

Dans une autre mesure, une extrême dilution de l'enzyme dans le milieu réactionnel peut conduire à une perte d'activité enzymatique due soit à l'instabilité de l'enzyme suite à une faible concentration en protéines, soit à la dissociation de ses sous-unités, ce qui la rend inactive (Fiechter, 1983; GE-Healthcare, 2010; Scopes, 1987; Tipton, 2002). Une autre conséquence de l'effet de dilution c'est la dissociation des cofacteurs, indispensables à l'activité enzymatique de l'enzyme (Tipton, 2002). Ces résultats sont similaires à ceux de Mehrnough *et al.* (2014), sur l'extraction de l'amylase des épluchures du dragonnier (*Hylocereus polyrhizus*) et, sont également compatibles avec le principe de transfert de matière où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de concentration de soluté entre le solide et le liquide (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2002).

3.1.3. Effet du temps d'extraction (X4)

Il ressort du tableau 5 que le temps d'extraction et son effet quadratique ont un impact significatif et négatif. Par conséquent, de longues durées d'extraction ne seraient pas favorables au maintien de l'activité enzymatique de la dextrinase limite extraite. En effet, de longues durées d'extraction peuvent causer la perte d'activité enzymatique en raison soit de la technique d'extraction qui peut être dénaturante pour les enzymes avec le temps (agitation, chauffage, oxydation en présence d'oxygène), soit à la libération progressive des protéases dans le milieu (Scopes, 1987). Cependant, à la figure 4, l'on peut observer qu'il existe une plage pour laquelle l'augmentation du temps d'extraction accroît de façon non significative l'activité enzymatique de la dextrinase limite.

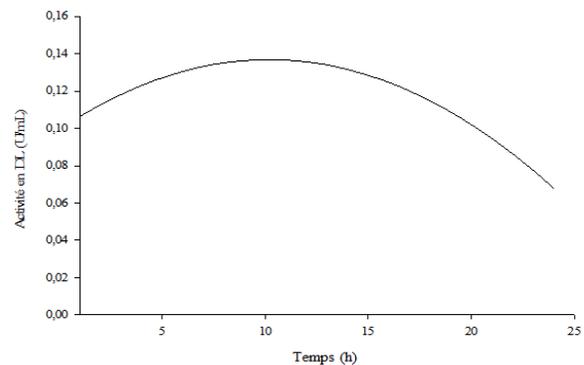


Figure 4: Activité enzymatique de la dextrinase limite en fonction du temps d'extraction (température: 27 °C; pH 5, 0; ratio : 1/6,5)

Ceci peut s'expliquer par le fait que l'augmentation du temps accroît la durée de contact entre le malt et le tampon, ce qui favoriserait davantage l'extraction. Cependant, cette plage reste très minime par rapport à celle où il y a baisse d'activité enzymatique avec le temps; d'où l'effet global négatif dû au temps d'extraction. En effet, l'on part d'une activité enzymatique de 0,106 U/mL après 1 h d'extraction, pour atteindre la valeur maximale de 0,136 U/mL après 10 h d'extraction ; suivi d'une diminution d'activité enzymatique jusqu'à 0,068 U/mL après 24 h d'extraction. Des résultats similaires ont été obtenus par Mehrnough *et al.* (2014), sur l'extraction de l'amylase des épluchures du dragonnier (*Hylocereus polyrhizus*).

3.1.3. Effet de l'interaction pH-temps d'extraction (X2X4)

Bien que le pH n'ait pas un impact significatif ($P > 0,05$) sur l'activité enzymatique de la dextrinase limite pendant l'extraction, son impact devient significatif en prenant en compte le temps d'extraction, ceci de façon positive ($P <$

0,05, tableau 5). Ce qui signifie que la synergie entre ces deux facteurs accroît l'activité enzymatique de la dextrinase limite au cours de l'extraction (figure 5).

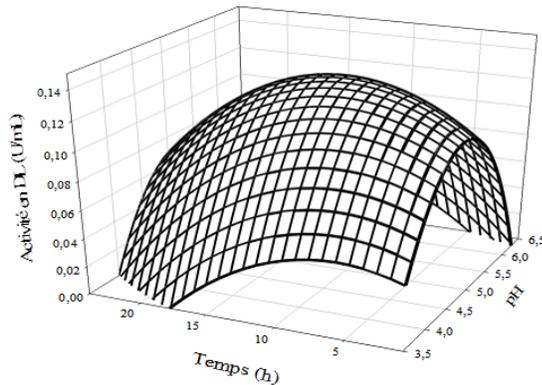


Figure 5: Courbe de surface de réponse de l'activité enzymatique en DL en fonction du pH et du temps (ratio : 1/6,5 ; température : 27 °C)

Il ressort de cette figure que l'augmentation simultanée, de même que la diminution simultanée de ces deux facteurs (jusqu'à 4,9 pour le pH, et jusqu'à 10,2 h pour le temps) contribuent à augmenter l'activité enzymatique en dextrinase limite.

Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que le temps peut être un facteur favorable à l'extraction de la dextrinase limite si les conditions de pH, entre autres, propices à l'extraction et à la stabilisation de l'enzyme sont réunies d'une part, et d'autre part, le temps peut être à la défaveur du maintien de l'activité enzymatique et de la stabilité de l'enzyme si les conditions de pH entre autres sont dénaturantes et/ou déstabilisantes pour l'enzyme. Les enzymes en effet sont des molécules amphotères renfermant des groupements acides et basiques chargés. Ces charges varient en fonction du pH

environnant (Hejnaes *et al.*, 1998; Andrés Illanes, Altamirano, & Wilson, 2008; Mohan, Long, & Mutneja, 2013). Les variations de charge avec le pH affectent l'activité enzymatique de l'enzyme, sa stabilité structurelle et même sa solubilité. Par ailleurs, des pH extrêmes pour l'enzyme causeront avec le temps des dénaturations irréversibles (Hejnaes *et al.*, 1998; Andrés Illanes *et al.*, 2008).

3.2. Optimisation de l'extraction de la dextrinase limite

Le logiciel Statgraphics version XV.II, a permis de faire ressortir les conditions d'extraction optimales de la dextrinase limite pour chaque facteur étudié tel que présentées dans le tableau 6. On observe dans ce tableau que les conditions optimales de température, de pH, de ratio masse de malt/volume de tampon et de temps pour l'extraction non dénaturante et maximale de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* sont respectivement de 23 °C, pH 5, ratio 5/32 pour un temps de 10 h. Ceci conduit à une activité enzymatique maximale théorique de 0,140 U/mL.

La vérification de l'activité enzymatique optimale théorique en dextrinase limite qui est de 0,140 U/mL aux points optimaux, a donné la valeur expérimentale de $0,106 \pm 0,001$ U/mL. Près de 76 % d'activité enzymatique sont retrouvées expérimentalement. Cette différence avec l'activité enzymatique optimale théorique serait due aux équipements et autres appareils de mesures.

L'optimum de température de 23 °C obtenu se rapproche de 24 °C utilisée pour l'extraction de la dextrinase limite dans le sorgho de variété Kafficorn et de l'orge (Hardie *et al.*, 1976; Heisner & Bamforth, 2008; Kristensen *et al.*, 1998).

Tableau 6: Points optimaux des facteurs pour l'extraction de la dextrinase limite

Facteur	Niveau bas	Niveau haut	Optimum en valeurs codées	Optimum en valeurs réelles
Température (°C)	-1,0	1,0	-0,189868	22,63 ≈ 23
pH	-0,866	0,866	-0,0352808	4,93 ≈ 5
Ratio m/v (g/mL)	-0,816	0,816	0,0242621	1/6,4 = 5/32
Temps d'extraction (Heure)	-0,791	0,791	-0,182701	9,84 ≈ 10

Activité enzymatique de la dextrinase limite (U/mL)	
Optimum théorique	Optimum expérimental
0,140	0,106 ± 0,001

Par ailleurs, cette température optimale de 23 °C n'est pas tout aussi éloignée des températures ambiantes qui se trouvent généralement autour de 24 °C. Par conséquent, l'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* pourrait être menée à température ambiante (voir même entre 20 et 30 °C d'après la figure 2) sans nécessité d'apport ou d'enlèvement d'énergie, ce qui réduit le coût du procédé.

L'optimum de pH d'extraction s'est situé à 5,0, valeur qui s'accorde avec les résultats de la bibliographie pour la dextrinase limite du sorgho Kafficorn, de l'orge et d'autres malts de céréales (Hardie *et al.*, 1976; Kristensen *et al.*, 1998; Longstaff & Bryce, 1993; McCleary, 1992). L'optimum obtenu ici en conditions naturelles (avec le pullulan naturel comme substrat) intègre les plages de pH de brassage de bières en brasserie, comprises entre 5,0 et 5,6 (Briggs, 1998; Macgregor, 1996; Sissons, Lance, & Sparrow, 1992). Aussi, l'utilisation de substrat naturel va en droite ligne des conditions

d'exploitation potentielle du malt de sorgho *Safrari* tant comme matière première brassicole, que comme source d'enzymes dans les procédés de transformation de l'amidon dont les plages de pH sont de 4,5-5,5 (Synowiecki, 2007).

Le ratio optimal de 5/32 se rapproche de la valeur de 1/5 utilisée par Heisner et Bamforth (2008) avec l'orge. L'extraction optimale de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* imposerait donc une dilution modérée. Ce ratio est également comparable à ceux employés pour le brassage des bières de sorgho compris entre 1/5 (Desobgo *et al.*, 2011c, 2011a, 2011b) et 1/6 (Igyor, Ogbonna, & Palmer, 2001; Nso, Ajebesone, Mbofung, & Palmer, 2003).

Toutefois, pour des applications technologiques, il serait plus intéressant d'avoir des plages de valeurs de facteurs permettant d'obtenir une activité enzymatique relativement acceptable; d'où l'importance de la courbe d'iso-réponses en fonction de l'interaction entre le pH et le temps (seule interaction significative ici),

mais cette fois-ci aux optima de ratio et de température respectivement de 5/32 et 22, 63 °C (figure 6).

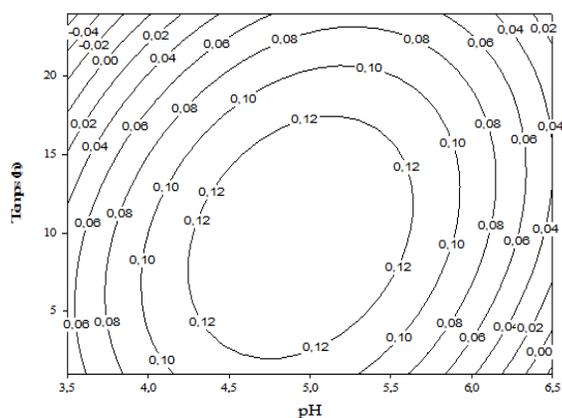


Figure 6: Courbe d'iso-réponse de l'activité enzymatique en dextrinase limite en fonction du pH et du temps (ratio : 5/32 ; température : 22,63 °C)

Il en ressort que pour avoir une activité enzymatique en dextrinase limite supérieure ou égale à 0,10 U/mL, le temps d'extraction et le pH doivent se situer dans l'aire définie à sa limite par l'iso réponse de 0,10 U/mL (Figure 6), ceci pour le ratio m/v optimum de 5/32 et la température optimale de 22,63 °C.

3.3. Effet de quelques additifs sur l'extraction de la dextrinase limite

Certains composés peuvent soit favoriser l'extraction complète de la dextrinase limite, soit inhiber l'enzyme au cours du processus d'extraction. L'effet de quelques-uns d'entre eux ont été étudié à savoir l'acide ascorbique et le dithiothréitol (DTT) comme agents antioxydants, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) comme inhibiteur de métalloenzymes, le chlorure de calcium comme cofacteur, et le sérum albumine bovine comme stabilisateur.

La figure 7 présente les résultats, par comparaison à l'extrait sans additifs (contrôle). On peut remarquer sur cette figure qu'aucun additif ne permet d'améliorer l'extraction de la dextrinase limite; au contraire, une baisse est notoire et varie de 12 % à 63 %.

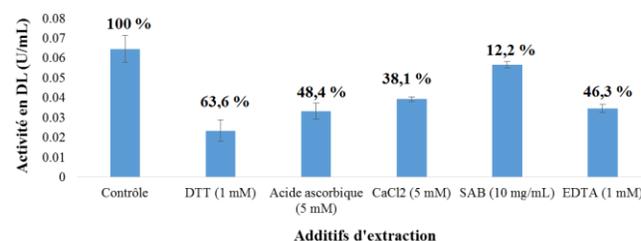


Figure 7: Effet de certains additifs sur l'extraction de la dextrinase limite

D'après cette figure, que ce soit des antioxydants ou stabilisateur ou cofacteur ou chélateur de métaux, tous seraient inhibiteurs pour l'extraction de la dextrinase limite.

En effet, les agents réducteurs (antioxydants) aident à maintenir les protéines à l'état réduit en empêchant l'oxydation des groupements sulfhydriles chez les enzymes qui en possèdent (Amersham-Biosciences, 2001; Laing & Christeller, 2004). Il semblerait que, soit la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* n'en possède pas, soit celle-ci ne serait pas en partie liée à des inhibiteurs par des ponts disulfures où un environnement réducteur permettrait la libération de la dextrinase limite par rupture de ces ponts (Longstaff & Bryce, 1993; Yamada, 1981a) et donc son activation. Par conséquent, la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* ne serait pas une enzyme sulfhydrile. La baisse d'activité enzymatique en dextrinase limite observée pourrait s'expliquer par le fait de l'inhibition par rupture des ponts disulfures des cys-protéines (qui seraient synthétisées

pendant la germination) par des composés sulfhydriles (agents réducteurs utilisés ici) en présence d'oxygène (Scopes, 1987). Les cystéinases permettraient l'activation de la dextrinase limite par des modifications protéolytiques (Longstaff & Bryce, 1993). Aussi, un éventuel effet inhibiteur dû à la technique de test d'activité enzymatique enzymatique (utilisation du pullulan naturel comme substrat et dosage des sucres réducteurs formés par la méthode au DNS) employée dans ces conditions n'est pas à exclure.

La baisse d'activité enzymatique en présence d'EDTA voudrait signifier que la dextrinase limite nécessiterait pour son activation pendant l'extraction, la présence d'ions métalliques divalents. Cependant, les ions calcium ne seraient pas indiqués en raison de la baisse d'activité enzymatique observée également en leur présence. Par ailleurs, il a été mentionné qu'il est parfois nécessaire de baisser la concentration en calcium en deçà de 10^{-7} mol.L⁻¹ dans la mesure où des concentrations au-delà peuvent faire varier l'activité enzymatique de certaines enzymes (Rothe, 1994); cela serait le cas ici (concentration de CaCl₂ de 5 mM) où la variation aurait consisté en la diminution d'activité enzymatique pendant l'extraction de la dextrinase limite. Il a été également observé une baisse d'activité enzymatique de la dextrinase limite de 15 % pendant l'extraction avec l'orge maltée en présence d'EDTA (Kristensen *et al.*, 1998).

Il est reconnu pour ce qui est du SAB d'avoir un effet stabilisateur pour certaines enzymes; mais cela ne fut pas le cas ici où il y a eu plutôt baisse d'activité enzymatique de l'ordre de 12 % pendant l'extraction. Heisner et Bamforth (2008) ont également observé une baisse d'activité

enzymatique de la dextrinase limite en présence de SAB avec l'orge, d'environ 25 %.

4. Conclusion

Il a été question dans cet article d'utiliser la MSR pour optimiser les paramètres d'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*. Il en est ressorti que les conditions optimales d'extraction ont été comparables à celles de bien d'auteurs avec d'autres céréales et même le sorgho. Par ailleurs, avec la MSR, l'on a également pu montrer que l'on pouvait avoir pour les facteurs étudiés, des plages de variation permettant d'atteindre un optimum d'activité enzymatique. Le secteur brassicole a été tout particulièrement prisé pour l'exploitation de ces différentes plages, ce qui a démontré encore l'intérêt d'utilisation du sorgho dans ce secteur d'activité enzymatique. Aussi, la non-nécessité à utiliser des additifs d'extraction limite les coûts du procédé.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont pas de conflits d'intérêt.

Éthique

Cette étude n'est pas faite sur des hommes ou des animaux

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement le Département de Génie des Procédés de l'École Nationale des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI), Université de Ngaoundéré (Cameroun), les laboratoires LAGETA et LBP de l'ENSAI et l'IUT respectivement ainsi que, l'université de Ngaoundéré pour avoir fourni les installations nécessaires à la réussite de ces travaux de recherche.

Bibliographies

- Adefila, O. A., Bakare, M. K., & Adewale, I. O. (2012). Characterization of an α -amylase from sorghum (*Sorghum bicolor*) obtained under optimized conditions. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(1), 63-69.
- Amersham-Biosciences. (2001). Protein Purification Handbook. (A.P. Biotech,Ed.) (AC). Amersham Pharmacia Biotech.
- Anuradha, J. S., & Valli, N. C. (2010). A new combinational statistical approach for cellulase optimization in *Aspergillus nidulans*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(8), 871-878.
- Baş, D., & Boyacı, I. H. (2007). Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845.
- Beatty, M. K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A. M., & James, M. G. (1999). Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. *Plant Physiology*, 119(1), 255-266.
- Briggs, D. E. (1998). Malts and malting (1st ed.). London: Blackie Academic.
- Claver, I. P., Zhang, H., Li, Q., Zhou, H., & Zhu, K. (2010). Optimized Conditions of Steeping and Germination and Their Effect on Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Composition. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(7), 686-695.
- Dalgaard, P., & Jørgensen, L. V. (1998). Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 105-115.
- Dennison, C. (2002). A Guide to Protein Isolation. (R. Kaptein, Ed.), A Guide to Protein Isolation (Vol. 3). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. (2011a). Modeling the action of technical mashing enzymes on extracts and free-amino nitrogen yields of the Madjeru sorghum cultivar. *Journal of Brewing and Distilling*, 2(3), 29-44.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. (2011b). Optimisation of the Action of Commercial Mashing Enzymes on Wort Extracts and Free Amino Nitrogen of the Safrari Sorghum Cultivar. *Technical Quarterly*, 48(3), 77-86.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. (2011c). The response surface methodology as a reliable tool for evaluating the need of commercial mashing enzymes for alleviating the levels of reducing sugars. *Journal of Brewing and Distilling*, 2(3), 29-44.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. (2011d). Use of the response surface methodology for optimizing the action of mashing enzymes on wort reducing sugars of the Madjeru sorghum cultivar. *African Journal of Food Science*, 5(2), 91-99.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., Tenin, D., & Kayem, G. J. (2010). Modelling and optimizing of mashing enzymes - Effect on yield of filtrate of unmalted sorghum by use of response surface methodology. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 62-69.
- Dunn, G., & Manners, D. J. (1975). The limit dextrinases from ungerminated oats (*Avena sativa* L.) and ungerminated rice (*Oryza sativa* L.). *Carbohydrate Research*, 39(2), 283-293.
- Evans, D. E., Li, C., & Eglinton, J. K. (2010). The properties and genetics of barley malt starch degrading enzymes. In G. Zhang & C. Li (Eds.), *Advanced Topics in Science and Technology in China* (pp. 143-189). Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fiechter, A. (1983). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin, Germany: Heidelberg : Springer Verlag.

- Fischer, E., & Stein, E. A. (1961). DNS Colorimetric Determination of Available Carbohydrates in Foods. *Biochemical Preparation*, 8, 30-37.
- GE-Healthcare. (2010). *Strategies for Protein Purification Handbook*. Uppsala, Sweden: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Goupy, J., & Creighton, L. (2006). *Introduction aux plans d'expériences* (3rd ed.). Paris: Usine Nouvelle, Dunod.
- Hardie, D. G., Manners, D. J., & Yellowlees, D. (1976). The limit dextrinase from malted sorghum (*Sorghum vulgare*). *Carbohydrate Research*, 50(1), 75-85.
- Heisner, C. B., & Bamforth, C. W. (2008). Thioredoxin in barley: Could it have a role in releasing limit dextrinase in brewery mashes? *Journal of the Institute of Brewing*, 114(2), 122-126.
- Hejnaes, K., Matthiesen, F., & Skriver, L. (1998). Protein Stability in Downstream Processing. In G. Subramanian (Ed.), *Bioseparation and Bioprocessing Vol II: processing, quality and characterization, economics, safety and hygiene* (pp. 31-65). WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Ibarz, A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2002). Unit operations in food engineering. *Unit Operations in Food Engineering* (1st ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Igyor, M. A., Ogonna, A. C., & Palmer, G. H. (2001). Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavour. *Process Biochemistry*, 36(11), 1039-1044.
- Illanes, Andrés. (2008). *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. (Andrés Illanes, Ed.), Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Springer Netherlands.
- Illanes, Andrés, Altamirano, C., & Wilson, L. (2008). Homogeneous enzyme kinetics. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications* (pp. 107-153). Springer Netherlands.
- Joglekar, A. M., & May, A. T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 32, 857-868.
- Karmakar, M., & Ray, R. R. (2011). Optimization of production conditions of extra cellular β -glucosidase in submerged fermentation of waterhyacinth using response surface methodology by *Rhizopus oryzae* MTCC 9642. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 299-308.
- Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E. G., Karamitros, C., & Labrou, N. E. (2012). Biocatalysis, Enzyme Engineering and Biotechnology. In B. K. Simpson, L. M. L. Nollet, F. Toldrá, S. Benjakul, G. Paliyath, & Y. H. Hui (Eds.), *Food Biochemistry and Food Processing* (pp. 125-166). John Wiley & Sons, Inc.
- Kristensen, M., Planchot, V., Abe, J. I., & Svensson, B. (1998). Large-scale purification and characterization of barley limit dextrinase, a member of the α -amylase structural family. *Cereal Chemistry*, 75(4), 473-479.
- Laing, W., & Christeller, J. (2004). Extraction of Proteins from Plant Tissues. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 38, pp. 4.7.1-4.7.7). John Wiley & Sons, Inc.
- Li, Q. F., Zhang, G. Y., Dong, Z. W., Yu, H. X., Gu, M. H., Sun, S. S. M., & Liu, Q. Q. (2009). Characterization of expression of the OsPUL gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5), 351-358.
- Longstaff, M. A., & Bryce, J. H. (1993). Development of limit dextrinase in germinated barley (*Hordeum vulgare* L.): Evidence of proteolytic activation. *Plant Physiology*, 101(3), 881-889.
- Macgregor, A. W. (1996). Malting and brewing science: Challenges and opportunities. *Journal of the Institute of Brewing*, 102(2), 97-102.

- MacGregor, A. W., Macri, L. J., Schroeder, S. W., & Bazin, S. L. (1994a). Limit dextrinase from malted barley: extraction, purification, and characterization. *Cereal Chemistry*, 71(6), 610-617.
- MacGregor, A. W., Macri, L. J., Schroeder, S. W., & Bazin, S. L. (1994b). Purification and Characterisation of Limit Dextrinase Inhibitors from Barley. *Journal of Cereal Science*, 20(1), 33-41.
- Manners, D. J., & Yellowlees, D. (1971). Studies on Carbohydrate Metabolising Enzymes. Part XXVI. The Limit Dextrinase from Germinated Barley. *Starch - Stärke*, 23(7), 228-234.
- Mathieu, D., & Phan-tan-luu, R. (1997). Approach of response surface methodology. In J. Driesbeke, J. Fine, & G. Saporta (Eds.), *Surface of experiments* (pp. 211-277). Paris, France: Technip editions.
- McCleary, B. V. (1992). Measurement of the content of limit-dextrinase in cereal flours. *Carbohydrate Research*, 227, 257-268.
- Mehnroush, A., Abd-Manap, Y., & Zohdi, N. (2014). Optimization of Processing Parameters for Extraction of Amylase Enzyme from Dragon (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Using Response Surface Methodology. *The Scientific World Journal*, 2014(2), 1-12.
- Mohan, C., Long, K. D., & Mutneja, M. (2013). *An Introduction to Inhibitors and Their Biological Applications* (1st ed.). Darmstadt, Germany: EMD Millipore Corporation, Billerica MA.
- Nethrphan, S. (2002). Study of starch debranching enzymes in developing wheat kernels. University of Saskatchewan Saskatoon.
- Nguemogne, A. C., Desobgo, Z. S. C., & Nso, E. J. (2017). Comparative study of limit dextrinase potential of three sorghum cultivars (Safrari, Madjeru, and S.35). *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3), 255-261.
- Nguemogne, A. C., Desobgo, Z. S. C., & Nso, E. J. (2018). A Screening approach for The Expression of Total Amylase activity during Malting of Safrari Sorghum Cultivar. *Research Journal of Science and Technology*, 10(4), 244-252.
- Nso, E. J., Ajebesone, P. E., Mbofung, C. M., & Palmer, G. H. (2003). Properties of Three Sorghum Cultivars Used for the Production of Bili-Bili Beverage in Northern Cameroon. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(3), 245-250.
- Piggott, R. (2002). Commercial enzyme production and genetic modification of source organisms. In R. J. Whitehurst & B. A. Law (Eds.), *Enzymes in food technology* (pp. 229-244). Sheffield: Sheffield Academic Press.
- Rajagopal, V., Ramakrishnan, P., & Indhumathi, J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*, 4, 89-91.
- Repellin, A., Båga, M., & Chibbar, R. N. (2008). In vitro pullulanase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) limit-dextrinase type starch debranching enzyme is modulated by redox conditions. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 302-309.
- Rodríguez-Nogales, J. M., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2007). Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. *Food Chemistry*, 101(2), 634-642.
- Rothe, G. M. (1994). *Electrophoresis of Enzymes: Laboratory Methods* (1st ed.). Springer Berlin Heidelberg.
- Scopes, R. K. (1987). *Protein Purification* (2nd ed.). New York: Springer-Verlag New York.
- Sissons, M. J., Lance, R. C. M., & Sparrow, D. H. B. (1992). Studies on limit dextrinase in barley I. Purification of malt limit dextrinase and production of monospecific antibodies. *Journal of Cereal Science*, 16(2), 107-116.
- Synowiecki, J. (2007). The use of starch processing enzymes in the food industry. In J. Polaina & A. P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes: Structure,*

Function and Applications (pp. 19-34). Springer Netherlands.

Tipton, F. K. (2002). Principles of enzyme assay and kinetic studies. In R. Eisinger & M. J. Danson (Eds.), *Enzyme Assays: A Practical Approach* (2nd ed., pp. 1-47). Oxford University Press.

Tucker, G.A. (1995). Fundamentals of enzyme activity. In G. A. Woods & L. F. J. Tucker (Eds.), *Enzymes in Food Processing* (pp. 1-25). Boston: Springer US.

Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., Wanapu, C., Arendt, E. K., & Zarnkow, M. (2011). Optimization of malting conditions for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). *Journal of the Institute of Brewing*, 117(1), 39-46.

Wu, C., Colleoni, C., Myers, A. M., & James, M. G. (2002). Enzymatic properties and regulation of ZPU1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406(1), 21-32.

Yamada, J. (1981a). Inactive debranching-enzyme in rice seeds, and its activation. *Carbohydrate Research*, 90(1), 153-157.

Yamada, J. (1981b). Purification of Oat Debranching Enzyme and Occurrence of Inactive Debranching Enzyme in Cereals. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 1013-1015.

Yamasaki, Y., Nakashima, S., & Konno, H. (2008). Pullulanase from rice endosperm. *Acta Biochimica Polonica*, 55(3), 507-510.

Zarnkow, M., Keßler, M., Burberg, F., Back, W., Arendt, E. K., & Kreis, S. (2007). The use of response surface methodology to optimise malting conditions of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) as a raw material for gluten-free foods. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(3), 280-292.

Cite this paper as: Nguemogne, A.C., Desobgo, Z.S.C., & Nso, J.E. (2020). Optimisation de l'Extraction de la Dextrinase Limite de la Variété de Sorgho Camerounais Safrari. *Journal of Food Stability*, 3 (2), 9-26

DOI: [10.36400/J.Food.Stab.3.2.2020-0016](https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.3.2.2020-0016)